

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Anna Kratochvílová**

Extracelulární váčky odvozené od mezenchymálních kmenových buněk a jejich využití v  
léčbě neurologických onemocnění

Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells and their use in the treatment of  
neurological disorders

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Michaela Hájková, Ph.D.

Praha, 2019

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Michaele Hájkové, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a nespočet rad během psaní této bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině, která mě v průběhu studia podporovala.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7.5.2019

Podpis:

## Abstrakt

Extracelulární váčky (EVs, extracellular vesicles) jsou váčky odvozené od buněčných membrán, které představují důležitou součást mezibuněčné komunikace a to přenášením cytosolických proteinů, lipidů a RNA mezi buňkami. Bylo potvrzeno, že mesenchymální kmenové buňky (MSCs, mesenchymal stem cells) jsou velmi schopnými producenty EVs, které mají terapeutické účinky srovnatelné se svými mateřskými buňkami. Nedávná zjištění navíc naznačují, že EVs mohou významně přispívat k jejich fyziologickým funkcím. Cílem této práce je představit extracelulární váčky odvozené z mesenchymálních kmenových buněk (MSC-EVs, extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells) jako novou bezbuněčnou alternativu k buněčné terapii a zaměřit se na jejich neuroprotektivní vlastnosti studované u různých neurologických onemocnění.

**Klíčová slova:** extracelulární váčky, bezbuněčná terapie, mesenchymální kmenové buňky, neurodegenerativní onemocnění

## Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are cell-derived membrane vesicles, which represent an important part of intercellular communication by transferring cytosolic proteins, lipids, and RNAs between cells. It has been proved that mesenchymal stem cells (MSCs) are potent producers of EVs with a therapeutic effect comparable to their parental cells. Moreover, recent findings suggest that EVs may strongly contribute to their physiological function. The aim of this thesis is to introduce extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells (MSC-EVs) as a novel cell-free alternative to the cell-based therapy and focus on their neuroprotective properties studied in various neurological diseases.

**Keywords:** extracellular vesicles, cell-free therapy, mesenchymal stem cells, neurodegenerative diseases

## Obsah

Seznam použitých zkratk.....	5
1. Úvod.....	7
2. Mesenchymální kmenové buňky .....	8
3. Imunomodulační vlastnosti MSCs.....	8
3.1 Problémy využití MSCs .....	10
4. Extracelulární váčky .....	10
4.1 Exosomy.....	11
4.2 Mikrovesikly.....	11
4.3 Metody izolace extracelulárních váčků .....	12
5. Extracelulární váčky odvozené od MSCs.....	14
5.1 Složení MSCs-EVs.....	14
5.2 Terapeutické využití MSC-EVs .....	15
6. Neuroprotektivní vlastnosti MSCs a MSC-EVs .....	15
7. Využití MSC-EVs pro léčbu neurologických onemocnění .....	17
7.1 Neurodegenerativní onemocnění .....	17
7.1.1 Alzheimerova choroba .....	17
7.1.2 Parkinsonova choroba.....	19
7.1.3 Další neurodegenerativní onemocnění.....	20
7.2 Ostatní neurologická onemocnění.....	21
7.2.1 Roztroušená skleróza .....	21
7.2.2 Cévní mozková příhoda .....	22
7.2.3 Traumatické poranění mozku.....	23
8. Závěr .....	23
9. Použité zdroje .....	24

## Seznam použitých zkratk

<b>AD</b>	Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba
<b>ALS</b>	amyotrophic lateral sclerosis, amyotrofická laterální skleróza
<b>ASCs</b>	adipose tissue -derived stem cells, kmenové buňky odvozené od tukové tkáně
<b>A<math>\beta</math></b>	peptid amyloid beta
<b>BM-MSCs</b>	bone marrow-derived mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky odvozené od kostní dřene
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor, mozkový neurotrofní faktor
<b>CD</b>	cluster of differentiation, diferenciační antigen
<b>COX-2</b>	cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2
<b>DCs</b>	dendritic cells, dendritické buňky
<b>EVs</b>	extracellular vesicles, extracelulární váčky
<b>Exo-APT</b>	exosomy konjugované s aptamery
<b>Gal-1</b>	galectin 1
<b>F4</b>	flow field-flow fractionation, frakcionace tokem v poli
<b>HD</b>	Huntington's disease, Huntingtonova choroba
<b>HGF</b>	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
<b>HLA</b>	human leucocyte antigen, lidský leukocytární antigen
<b>Hsp</b>	heat shock protein, protein teplotního šoku
<b>IDO</b>	indolamine 2,3-dioxygenase, indolamin 2,3-dioxygenáza
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IL</b>	interleukin
<b>mHtt</b>	mutovaný protein huntingtin
<b>miRNA</b>	microRNA, mikroRNA
<b>miscRNA</b>	miscellaneous RNA
<b>MS</b>	multiple sclerosis, roztroušená skleróza

<b>MSCs</b>	mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky
<b>NEP</b>	neprilysin
<b>NGF</b>	nerve growth factor, nervový růstový faktor
<b>NO</b>	nitric oxide, oxid dusnatý
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, fosfátem pufovaný fyziologický roztok
<b>PD</b>	Parkinson's disease, Parkinsonova choroba
<b>PD-L1</b>	programmed death ligand 1, ligand programované buněčné smrti 1
<b>PGE-2</b>	prostaglandin E2
<b>pre-miRNA</b>	precursor microRNA, prekurzorová mikroRNA,
<b>SEC</b>	size exclusion chromatography, rozměrově vylučovací chromatografie
<b>siRNA</b>	small interfering RNA, malá interferující RNA
<b>SOD1</b>	superoxide dismutase 1, superoxiddismutáza 1
<b>TBI</b>	traumatic brain injury, traumatické poškození mozku
<b>TGFβ</b>	transforming growth factor β, transformující růstový faktor β
<b>Th</b>	T helper cells, pomocné T lymfocyty
<b>TNFα</b>	tumor necrosis factor α, faktor nádorové nekrózy α
<b>Treg</b>	regulatory T cells, regulační T lymfocyty
<b>Tsg101</b>	tumor susceptibility gene 1
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule 1, cévní adhezivní molekula 1
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor

## 1. Úvod

Mezibuněčná komunikace je esenciální vlastností mnohobuněčných organismů a může probíhat přímým kontaktem nebo přenosem sekretovaných molekul. Třetí nově popsany mechanismus je zprostředkován extracelulárními váčky (EVs, extracellular vesicles). Ty se vyznačují schopností přenášet různé proteiny, lipidy a RNA do vzdálených tkání a dokonce jsou schopny překonat hematoencefalickou bariéru. K hlavním typům EVs patří exosomy a mikrovesikly, které jsou produkovány řadou buněčných typů včetně mesenchymálních kmenových buněk (MSCs, mesenchymal stem cells). Tyto buňky s jedinečnými terapeutickými vlastnostmi jsou v současné době považovány za jedny z vůbec nevykonnějších producentů EVs. Novější studie naznačují, že podstatná část příznivých účinků MSCs může být vysvětlena právě sekrecí různých molekul a EVs. Rovněž bylo pozorováno, že extracelulární váčky odvozené z mezenchymálních kmenových buněk (MSC-EVs, mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles) mohou v cílových tkáních nahradit efekt samotných buněk.

Cílem této práce je představit MSC-EVs jako novou a slibnou bezbuněčnou alternativu, která by řešila některé problémy spojené s buněčnou terapií. Zároveň blíže charakterizovat obsah MSC-EVs a popsat jejich neuroprotektivní vlastnosti. To souvisí s jejich využitím pro léčbu neurodegenerativních (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova choroba), ale i jiných neurologických onemocnění (roztroušená skleróza, cévní mozková příhoda a traumatické poškození mozku), kterým jsou věnovány poslední kapitoly.

## 2. Mesenchymální kmenové buňky

MSCs byly poprvé izolovány z kostní dřeně (Friedenstein et al., 1966), která je jejich primárním zdrojem. Přestože se jedná o hlavní zdroj těchto buněk, tvoří zde pouze 0,01% – 0,001% z celkové populace. Později však byly nalezeny téměř ve všech lidských tkáních, například v zubní dřeni, periferní krvi, tukové tkáni, placentě, nebo ve fetálních tkáních jako je pupečník, pupečnicková krev a Whartonův rosol (Hass et al., 2011). Jedná se o multipotentní, nehematopoetické kmenové buňky, které se vyznačují schopností sebeobnovy. Mohou diferencovat v adipocyty, chondrocyty nebo osteoblasty (mezoderm) (Pittenger et al., 1999), ale byla prokázána i diferenciace v buňky dalších dvou zárodečných listů – např. nervové buňky (ektoderm) (Takeda and Xu, 2015) či beta buňky Langerhansových ostrůvků (endoderm) (Kassem et al., 2016).

S ohledem na pleiotropní povahu MSCs z různých tkání stanovila Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (ISCT, International Society for Cell & Gene Therapy) tři základní kritéria pro identifikaci MSCs:

- 1) Za standartních kultivačních podmínek buňky adherují k plastu.
- 2) Buňky mají morfologii podobnou fibroblastům a za vhodných podmínek diferencují na adipocyty, chondrocyty nebo osteoblasty, přičemž diferenciace může být prokázána specifickým barvením. Pro adipocyty se využívá barvení Oil Red O, pro chondrocyty Alcian blue nebo imunohistochemické barvení pro kolagen typu II a pro osteoblasty specifické barvení Alizarin Red nebo von Kossa.
- 3) Buňky neexprimují klíčové hematopoetické znaky, kterými jsou diferenciační antigeny (CD, cluster of differentiation) CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19, CD79 $\alpha$ , CD19 a lidské leukocytární antigeny (HLA, human leucocyte antigen) třídy II. Naopak exprimují CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin) a CD73 (ekto-5'-nukleotidáza). Tyto zmíněné molekuly byly navrženy jako jejich markery.

Výše zmíněná minimální kritéria mohou být v budoucnu vlivem objevu nových markerů, či vlastností MSCs dále modifikována (Dominici et al., 2006).

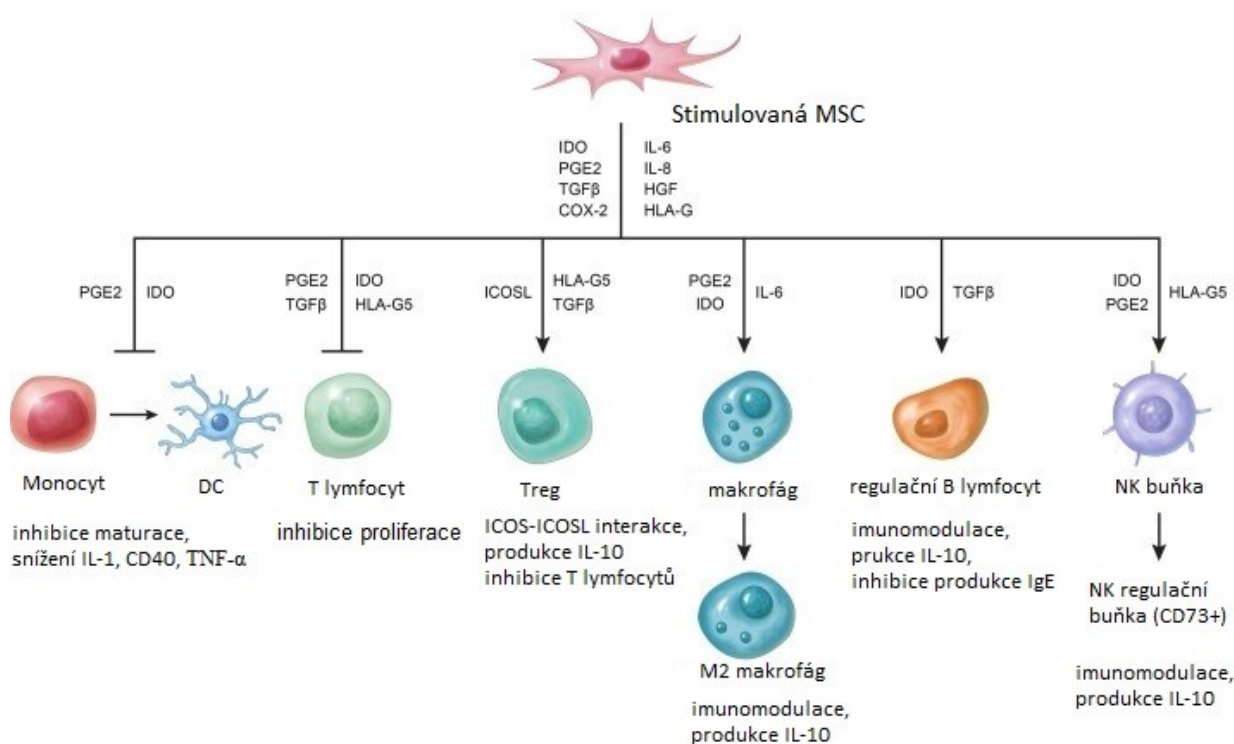
Kromě MHC II neexprimují buňky na svém povrchu ani kostimulační molekuly, jako B7-1, B7-2, CD40, CD40L nebo Fas ligand, které hrají zásadní úlohu při aktivaci imunitní odpovědi. Tyto jejich znaky, společně s imunomodulačními vlastnostmi, z nich činí vhodné kandidáty pro řadu buněčných terapií. Nabízí se také možnost jejich využití pro navození dlouhodobé tolerance po transplantacích bez škodlivých efektů vznikajících působením imunosupresivních látek (Kaundal et al., 2018).

## 3. Imunomodulační vlastnosti MSCs

K dalším významným vlastnostem MSCs patří schopnost imunomodulace (viz. obr. 1). Ta může probíhat prostřednictvím solubilních molekul, váčků nebo mezibuněčným kontaktem. K solubilním



molekulám patří například prostaglandin E2 (PGE-2), indoleamin 2,3-dioxygenáza (IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase), oxid dusnatý (NO, nitric oxide), cyklooxygenáza 2 (COX-2, cyclooxygenase 2), interleukin 10 (IL-10), IL-6, transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) a růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor). MSCs exprimují také adhezivní molekuly jako je ligand programované buněčné smrti 1 (PD-L1, programmed death ligand 1), cévní adhezivní molekula (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) a galectin 1 (Gal-1)(Gao et al., 2016; Najar et al., 2012).



**Obrázek 1 – Imunomodulační působení MSCs na buňky imunitního systému.**

MSCs působí na buňky přirozené i získané imunity. Inhibují maturaci monocytů v dendritické buňky (DCs, dendritic cells), u kterých mimo jiné snižují expresi kostimulačních molekul a produkci faktoru nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ) a IL-1. Inhibují proliferaci a ovlivňují apoptózu u T lymfocytů, podporují však regulační T lymfocyty (Treg, regulatory T cell). U pomocných T-lymfocytů 1 (Th1, T helper cells 1) lymfocytů je potlačena produkce interferonu  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), naopak je podpořena sekrece IL-4 u Th2 lymfocytů. U makrofágů indukují polarizaci na imunosupresivní M2 fenotyp, charakterizovaný zvýšenou schopností fagocytózy a zvýšenou sekrecí protizánětlivého IL-10. MSCs indukují regulační fenotyp u B lymfocytů a NK buněk. Zkratky: PGE2 (prostaglandin E2), IDO (indoleamine 2,3-dioxygenáza, indoleamine 2,3-dioxygenase), TGF $\beta$  (transformující růstový faktor  $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ), COX-2 (cyklooxygenáza-2, cyclooxygenase 2), IL-6 (interleukin 6, interleukine 6), IL-8, HGF (růstový faktor hepatocytů, hepatocyte growth factor), HLA-G (lidský leukocytární antigen-G, human leukocyte antigen-G) ICOSL (ligand indukovatelné kostimulační molekuly, inducible costimulator ligand). Převzato a upraveno: (Lee and Song, 2018)

### 3.1 Problémy využití MSCs

Přestože MSCs vykazují oproti ostatním kmenovým buňkám řadu výhod, jejich klinická aplikace se stále potýká s problémy, mezi které patří například obtížná izolace dostatečného množství buněk nebo ztráta účinnosti vlivem dlouhodobé kultivace a pasážování (Bonab et al., 2006). Komplikace působí také akumulace v plicích po intravenózním podání, protože plicní kapiláry jsou v průměru podstatně užší než je velikost MSCs. Roli hraje i adhezivita buněk. Cílená migrace MSCs do ostatních orgánů může být tedy nedostatečná (Turtzo et al., 2015; Wang et al., 2015). Po intravenózní aplikaci u myši bylo navíc pozorováno zmenšení buněk, ztráta jaderného signálu a jejich defragmentace. Zaznamenány byly některé markery apoptózy, jako například annexin V, zvýšený signál propidium jodidu, či aktivace kaspázy-3/7. Buněčné fragmenty se opět převážně vyskytovaly v plicích, dále pak v játrech (Leibacher et al., 2017). Problematická je také mortalita zaznamenaná u malých laboratorních zvířat po intravenózním podání, u člověka však bylo prokázáno jako bezpečné (Furlani et al., 2009; Glassberg et al., 2017). Potíže může působit i to, že transmigrační MSCs probíhá minimálně dvěma mechanismy. První je podobný leukocytům a s rychlejší kinetikou, ovšem druhý probíhá v mnohem delším časovém rámci (3 - 6 vs. 30 – 120 minut) (Teo et al., 2012). Alternativou k intravenózní aplikaci MSCs je jejich lokální injekce, ale problémem je nedostatečné přežívání buněk v cílových tkáních. Transplantace buněk totiž tkáň naruší, což vede k nekróze a zároveň spouští lokální aktivitu buněk vrozené imunity, například NK buněk, které v transplantovaných MSCs indukují apoptózu (Poltavtseva et al., 2018). Nejzávažnější otázkou však zůstává potencionální maligní transformace MSCs způsobena převážně vlivem stárnutí, doprovázeným snižováním aktivity telomerázy, která byla pozorována v několika studiích (Gonzalez et al., 2017; Røslund et al., 2009). Z těchto uvedených důvodů se jako vhodná alternativa MSCs, nebo buněčné terapie obecně jeví využití extracelulárních váčků.

### 4. Extracelulární váčky

Extracelulární váčky (EVs, extracellular vesicles) jsou sekretovány řadou buněčných typů, mezi které mimo jiné patří T a B lymfocyty, dále DC, žírné, embryonální, endoteliální, epiteliální a nervové buňky, nebo právě MSCs (Frühbeis et al., 2013; Zhang et al., 2016). Navzdory původní představě, že extracelulární váčky slouží pouze k odstraňování různorodých molekul, se ukázalo, že zastávají stěžejní roli během buněčné komunikace (Ratajczak et al., 2006). Studovány jsou ale i v řadě patologických procesů, zejména u nádorových buněk (Haraszti et al., 2016) a u degenerativních onemocnění, jako jsou například Alzheimerova či Parkinsonova choroba (Soria et al., 2017). Výhodou EVs oproti vlastním buňkám je jejich vyšší bezpečnost, která spočívá jednak v jejich menší velikosti, díky čemuž nehrozí ucpání kapilár, ale také v tom, že nejsou schopné přímo tvořit nádory. Navíc by jejich produkce vyžadovala menší náklady, než buněčná terapie. EVs je také možné zamrazit a uskladnit na delší dobu. Velkou výhodou je také to, že EVs nejsou toxické a v porovnání se syntetickými nanosystémy mají EVs

nižší antigenicitu, rovněž jsou více stabilní v krevním řečišti (Crivelli et al., 2017; Nooshabadi et al., 2018).

Na tomto místě je nutné zmínit i nevýhody využití EVs, mezi které patří hlavně složitost a cena jejich izolace. Jednodušší a levnější možností by bylo v některých případech produkovat lipozomy s příslušnými terapeutickými složkami. Je ovšem těžké určit, které všechny složky se na příznivých účincích podílí (Poltavtseva et al., 2018). Problémy dále může působit heterogenita nákladu EVs, závislá nejen na kultivačních podmínkách buněk, ale také na tom z jaké tkáně MSCs pocházejí (Nooshabadi et al., 2018). Otázkou také zůstává role MSC a MSC-EVs během tumorigeneze a metastázování. Existují studie, které tvrdí, že MSC-EVs jsou schopné inhibovat proliferaci nádorových buněk, na druhou stranu jiné naznačují podpoření růstu nádoru. Nejprve je tedy třeba mechanismus jejich chování vysvětlit a najít cestu, jak zamezit možným nežádoucím účinkům (Crivelli et al., 2017).

Hlavními druhy extracelulárních váčků jsou exosomy a mikrovesikly (viz. obr. 2), jelikož se jejich biogeneze značně liší, jsou zde pro větší přehlednost popsány zvlášť:

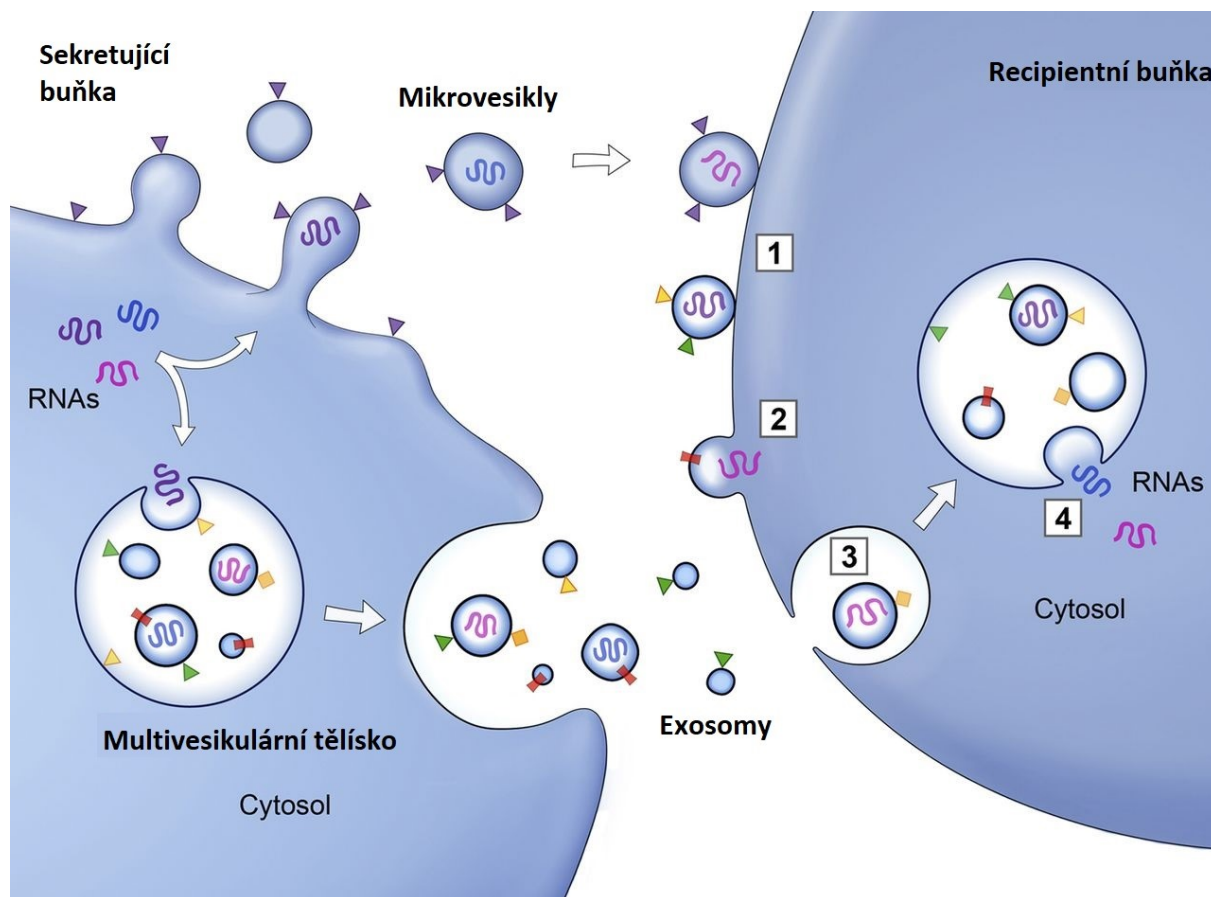
## 4.1 Exosomy

Exosomy pocházejí z endocyticko-exocytické dráhy a mají tedy endosomální původ. Postupnou maturací endosomů vznikají multivesikulární tělíska, které fúzí s cytoplazmatickou membránou a jsou po uvolnění do extracelulárního prostoru označovány za exosomy (Keshtkar et al., 2018). V průměru mají exosomy od 40 do 100 nm. Obalem je dvouvrstvá lipidická membrána bohatá na cholesterol, ceramid a sfingolipidy, která jednak chrání vnitřní obsah váčku a zároveň umožňuje pohyb po tkáních na delší vzdálenost. Exosomy obsahují annexiny, Alix, klatrin, Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101), terasplasminy CD9, CD63 a CD81 a proteiny tepelného šoku (Hsp, heat shock protein) Hsp60, Hsp70 a Hsp90. Náklad exosomů se vyznačuje velkou různorodostí proteinů i genetického materiálu jako například mRNA, mikroRNA (miRNA, microRNA), prekurzorová mikroRNA (pre-miRNA, precursor microRNA) a další nekódující RNA. Do recipientní buňky se dostávají jak receptorem zprostředkovanou endocytózou, tak přímým splynutím membrány váčku s membránou buňky. Ovšem také může být přenesen pouze obsah váčku po interakci s receptorem. (Keshtkar et al., 2018; Tan et al., 2013).

## 4.2 Mikrovesikly

Mikrovesikly se tvoří pučením a následným odštěpením od plasmatické membrány. Tento proces zahrnuje reorganizaci cytoskeletu a na rozdíl od exosomů je závislý na koncentraci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Oproti exosomům jsou mikrovesikly větší, o průměru 100 – 1000 nm. Dvouvrstvá membrána je bohatá na cholesterol, ceramid, sfingomyelin a proteiny obsahující fosfatidylserin, které jsou spojené s lipidovými rafty. Mezi povrchové markery patří mimo jiné například CD40. Rovněž může

přenášet různorodé složení proteinů i genetického materiálu, ale kontakt s recipientní buňkou probíhá přes specifické interakce receptor-lingand (Keshtkar et al., 2018; Rani et al., 2015).



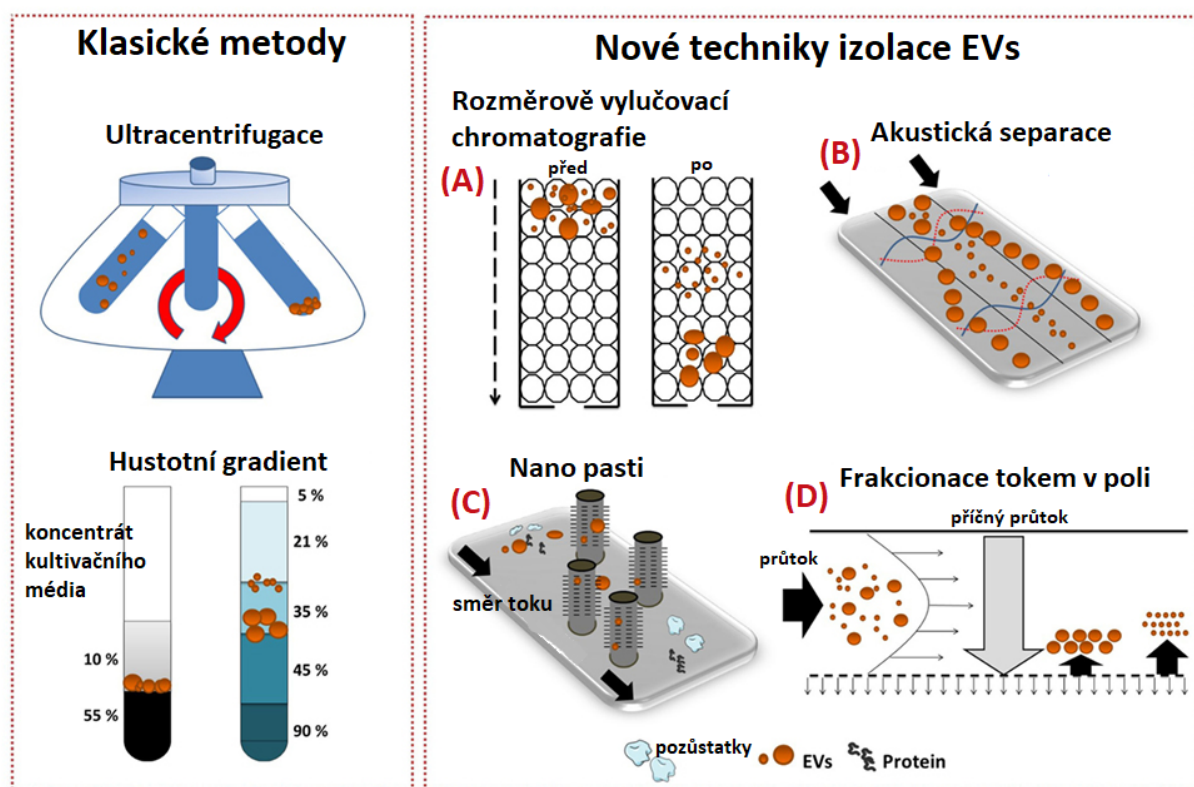
**Obrázek 2 – rozdíly v původu, velikosti a složení extracelulárních váčků.**

Exosomy se od mikrovesiklů liší zejména svojí biogenezí, která má původ v endocyticko-exocytické dráze, kdežto Mikrovesikly vznikají pučením od plasmatické membrány. Oba typy extracelulárních váčků se navíc odlišují povrchovými markery a částečně i svým obsahem. Mikrovesikly nebo exosomy mohou do buňky náklad přenášet buď: (1) kontaktem s cytoplazmatickou membránou, (2) přímou fúzí nebo (3) receptorem zprostředkovanou endocytózou. (4) EVs pak mohou pokračovat endocytickou dráhou. Převzato a upraveno: (Raposo and Stoorvogel, 2013)

### 4.3 Metody izolace extracelulárních váčků

EVs mohou být izolovány z mnoha druhů tělních tekutin jako je například krev, moč, plodová tekutina, synoviální tekutina či z tekutiny získané bronchoaveolární laváží, ale také ze supernatantu vzniklého v buněčné kultuře (Rani et al., 2015). Proto, aby mohly být zdárně studovány, musí být EVs účinně izolované od buněčných pozůstatků, či jiných interferujících komponent. Izolační metody působí na integritu exosomů, jejich *in vivo* distribuci i stabilitu v čase. Z toho důvodu je snaha najít co nejšetrnější techniku, která izoluje bioaktivní váčky a zachová jejich integritu.

Ultracentrifugace je patrně vůbec nejčastěji používanou metodou izolace váčků, což je dáno především relativní snadností přípravy. Například ale při diferenciální ultracentrifugaci může docházet k agregaci vesiklů a koisolaci solubilních faktorů a proteinů, což je způsobeno hlavně heterogenitou ve velikosti extracelulárních váčků (Willis et al., 2017). Mezi nové metody (viz. obr. 3) patří například Size exclusion chromatography (SEC, volně přeloženo jako: „rozměrově vylučovací chromatografie“), Flow field-flow fractionation (F4, volně přeloženo jako: „frakcionace tokem v poli“), Nano traps (volně přeloženo jako: „nano pasti“) a akustická separace (Baranyai et al., 2015; Li et al., 2017). Izolované EVs mohou být skladovány při  $-80^{\circ}\text{C}$  po dobu více než 3 měsíců, přičemž si stále zachovávají svou funkci (Laso-García et al., 2018).



**Obrázek 3 – některé metody využívané k izolaci extracelulárních váčků.**

K běžným metodám izolace extracelulárních váčků patří různé typy ultracentrifugace. Mezi nové metody izolace patří například: (A) SEC, kde se porózní stacionární fáze využívá k třídění makromolekul na základě jejich velikosti. Póry prochází komponenty s malým hydrodynamickým rádiusem a komponentům s velkým hydrodynamickým rádiusem je průchodu přes póry zbráněno. (B) Při akustické separaci se využívá ultrazvukového stojatého vlnění. Na větší částice působí větší radiální síly a migrují rychleji k tlakovým uzlům. (C) Nano-traps jsou složeny z obrvených mikropilířů, které zachytávají exosomy a oddělují je od proteinů, jiných extracelulárních váčků, či buněčných součástí. Zachycené exosomy je možné získat neporušené rozpuštěním v pufru PBS. Ovšem je nutné poznamenat, že účinnost sběru je zatím nízká. (D) F4 (flow field-flow fractionation) pro izolaci a oddělení exosomů užívá porézní obdélníkový kanál, kde parabolický průtok probíhající kolem osy kanálu nese vzorek směrem ke konci kanálu, zatímco průtok kanálem napříč řídí zadržení vzorku a rozděljuje



částice proti stěně průtokové komory. Posléze se makromolekuly rozdělí na základě rozdílů v difuzivitě, přičemž menší částice eluují dříve než větší. Převzato a upraveno: (Willis et al., 2017)

## 5. Extracelulární váčky odvozené od MSCs

Přes svoji schopnost diferenciaci v řadu buněčných typů, se hlavní potenciál využití MSCs skrývá převážně v jejich parakrinní sekreční aktivitě. Extracelulární váčky odvozené od MSCs (MSC-EVs, mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles) byly poprvé studovány v roce 2010 na myším modelu ischemicko-reperfúzního poškození (Lai et al., 2010) a do té doby již proběhla řada dalších studií na jiných modelech, včetně cévní mozkové příhody (Xin et al., 2013a) traumatického poškození mozku (Kim et al., 2015) nebo Parkinsonovy choroby (Teixeira et al., 2017). Kromě klasických povrchových markerů exosomů, mezi které patří například CD9, CD63 a CD81, se na povrchu exosomů odvozených od MSCs vyskytují i adhezivní molekuly jako CD29, CD44 a CD73 exprimované na membráně MSCs (Yu et al., 2014). MSCs jsou v současné době považovány za jedny z nejvýkonnějších producentů exosomů (Yeo et al., 2013). Ovšem jak intenzita sekrece, tak proteinové a RNA složení extracelulárních váčků jsou závislé na podmínkách a stimulech, kterým jsou buňky vystaveny. Například u MSCs kultivovaných v hypoxických podmínkách (<5% O<sub>2</sub>) byla zjištěna změna proteinové exprese oproti MSCs kultivovaných za standardních podmínek (21% O<sub>2</sub>) (Willis et al., 2017). Fyziologicky je většina tkání vystavena mnohem nižšímu tlaku. V kostní dřeni, odkud pochází většina MSCs, se hodnoty pohybují kolem 40 mmHg, což je oproti 159 mmHg za 21% O<sub>2</sub> značný rozdíl. Nicméně účinky optimální koncentrace O<sub>2</sub> pro sekreci exosomů zatím nebyly dostatečně popsány (Willis et al., 2017). Důležitým poznatkem je, že v cílových tkáních mohou MSCs-EVs nahradit efekt samotných buněk a interagovat jak s přilehlými buňkami, tak i na větší vzdálenost (Crivelli et al., 2017). Například byly prokázány podobné účinky na buňky vrozené i získané imunity (Budoni et al., 2013; Di Trapani et al., 2016).

### 5.1 Složení MSCs-EVs

Jak již bylo zmíněno výše, extracelulární váčky obsahují heterogenní náklad proteinů, lipidů a genetického materiálu. V porovnání s vlastními buňkami se složení RNA liší, což by mohlo být vysvětleno selektivní inkorporací různých RNA (Baglio et al., 2015). U exosomů byly nejvíce sledovány miRNA, které mají schopnost inhibice své cílové mRNA v recipientní buňce (Mittelbrunn et al., 2011). Bylo pozorováno, že sekreční profil se pod vlivem různých prozánětlivých stimulů mění. Například v exosomech pocházejících z MSCs vystavených tkáni po okluzi střední mozkové tepny (MCAo, middle cerebral arterial occlusion) se oproti kontrole vystavené normální mozkové tkáni významně zvýšil obsah miR-133b důležité pro funkční regeneraci axonů motorických neuronů (Xin et al., 2012). Pozdější studie na krysím modelu s MCAo potvrdila, že miR-133b přenesená exosomy podporuje neurální plasticitu a funkční obnovu po cévní mozkové příhodě (Xin et al., 2013b). Ačkoliv bylo u MSC-

EVs detekováno přes 150 různých druhů miRNA (Ferguson et al., 2018), ukazuje se, že se jedná pouze o malou část z celkového obsahu RNA, protože MSC-EVs obsahují i množství miscellaneous RNA (miscRNA), tRNA a rRNA (Baglio et al., 2015). Sekretovaná je ale také pre-miRNA (Chen et al., 2010).

Proteomické studie se v celkovém počtu obsažených proteinů značně liší, nicméně odhalily až 987 různých druhů proteinů (Lai et al., 2016). Byly detekovány proteiny podílející se na ochraně proti oxidativnímu stresu, jako je glutathion S-transferáza, superoxid dismutáza, laktátdehydrogenáza A a B nebo disulfid izomeráza (Angulski et al., 2017). Dále byly zjištěny také například všechny podjednotky 20S proteazomu (Lai et al., 2012), faktory podílející se na buněčné proliferaci, apoptóze, zánětlivé odpovědi, regeneraci tkání, vývoji epitelu, respiračního systému, proteiny cytoskeletu či proteiny podílející se na remodelaci extracelulární matrix (Eirin et al., 2016). Mezi angiogenními faktory byly v MSC-EVs detekovány například vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), C-C chemokinový ligand 2, angiogenin a angiopoietin-1 (Chen et al., 2014). Zjištěny byly také neurotrofní faktory jako nervový růstový faktor (NGF, nerve growth factor), mozkový neurotrofní faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), neuregulin-2 a neurotrofin-5 (Lai et al., 2012; Reza-Zaldivar et al., 2018). MSC-EVs rovněž obsahují řadu chemokinů a cytokinů, mezi nimiž byly detekovány IL-1 $\beta$ , L-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů. Ve vysoké míře však exprimují pouze IL-6 a IL-8 (Zhang et al., 2016)

## 5.2 Terapeutické využití MSC-EVs

Nedávno byla přihlášena první klinická studie, která by se měla zabývat bezpečností podání MSC-EVs předčasně narozeným novorozencům s vysokým rizikem rozvinutí bronchopulmonální dysplasie (<https://clinicaltrials.gov/>, online). Příznivé účinky MSC-EVs byly však již předtím pozorovány na řadě zvířecích modelů pro různá onemocnění plic, srdce, mozku, jater nebo ledvin, ale také například při hojení ran (Willis et al., 2017). V této práci jsem se zaměřila na jejich využití pro léčbu neurologických onemocnění. Pro řadu z nich doposud neexistuje efektivní léčba a MSC-EVs by tak mohly představovat nadějnou novou terapii.

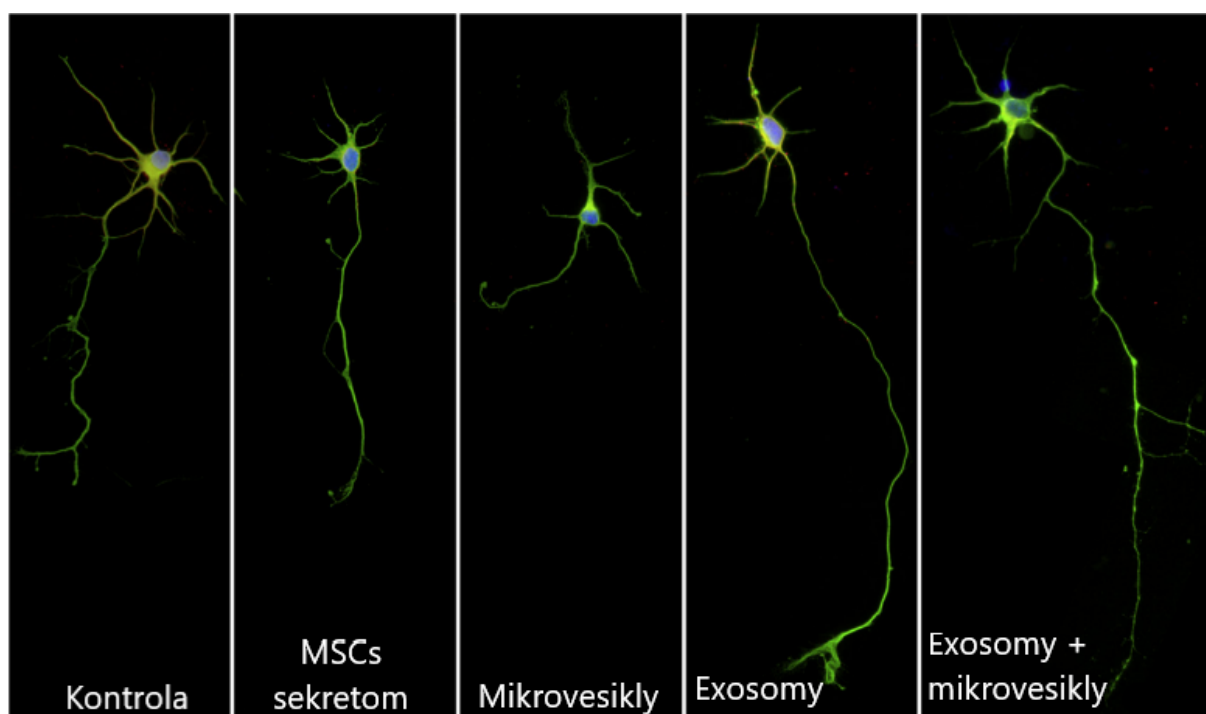
## 6. Neuroprotektivní vlastnosti MSCs a MSC-EVs

Ačkoliv se pro léčbu neurodegenerativních onemocnění jako nejvhodnější jeví nervové kmenové buňky, možnost jejich využití v praxi je složitá, protože musí být extrahovány z nervové tkáně. Snaha získat jejich dostatečné množství by pravděpodobně vedla ke značnému poškození pacienta. Další nevýhodou je, že po in vivo aplikaci mohou zůstat v nediferencované formě a navíc jsou citlivé na imunitní odpovědi při alogenní transplantaci (Lo Furno et al., 2018). Naproti tomu MSCs mohou být izolovány z řady lidských tkání včetně tukové, která je dostupná ve velkém množství. Navíc nevyžadují imunosupresivní léčbu jako prevenci rejekce (Bonafede and Mariotti, 2017). Vyjma schopnosti diferencovat v neurony vykazují MSCs řadu dalších neuroprotektivních vlastností, mezi které patří

stimulace neurogeneze a angiogeneze, nebo antiapoptotické, protizánětlivé a imunomodulační účinky. Přestože přesný mechanismus terapeutických účinků po transplantaci MSCs zatím nebyl objasněn, může být vysvětlen parakrinní sekrecí neurotrofních faktorů a cytokinů (Lo Furno et al., 2018). Pod vlivem MSCs mohou progenitorové buňky diferenciovat v astrocyty, oligodendrocyty i neurony. Dále indukují vznik neropilinu-1 a 2, neuregulinu-1 a Ephrinu B2, faktorů hrajících stěžejní roli v regulaci růstu axonů, formaci synapsí, či integraci neuronálních sítí. MSCs podporují proliferaci a diferenciaci oligodendrocytových progenitorů a zároveň zajišťují myelinizaci nově zformovaných axonů (Berger and Söder, 2015). MSCs vlastní sekrecí i působením na nervové buňky podporují zvýšení hladiny klíčových neurotrofních faktorů v mozku, jako je například nervový růstový faktor NGF, BDNF, fibroblastový růstový faktor 2, neurotrofin 3, VEGF, neurotrofický faktor odvozený od gliových buněk, epidermální růstový faktor a sonic hedgehog, které zauímají hlavní roli nejen v proliferaci progenitorových buněk, ale i v neurogenezi a diferenciaci (Van Velthoven et al., 2011; Volkman and Offen, 2017). Dále bylo prokázáno, že během chronických zánětlivých procesů v CNS potlačují MSCs aktivovaný prozánětlivý fenotyp neuroglií a indukují jeho změnu na protizánětlivý. Současně dochází i ke snížení apoptózy neuronů (Volkman and Offen, 2017).

Podobně jako u MSCs, i u MSC-EVs byla prokázána řada neuroprotektivních účinků. Nejprve bylo pozorováno, že exosomy z MSCs z různých zdrojů selektivně podporují růst neuritů u primární kultury neuronů (viz. obr. 4). Kupodivu frakce obohacená o mikrovesikly z MSCs však měla spíše inhibiční účinky. Protože neurity ve směsi exosomů a mikrovesiklů z MSCs stále rostly, autoři se domnívají, že exosomy v tomto modelu potlačily inhibiční účinky mikrovesiklů (Lopez-Verrilli et al., 2016). Příznivé účinky exosomů z MSCs na růst byly objeveny i u axonů kortikálních neuronů a tento efekt se ještě zvýšil po aplikaci upravených exosomů, obohacených o miRNA klastr miR-17-92. Je však třeba podotknout, že při aplikaci vysoké koncentrace exosomů ( $3 \times 10^9$  částic/ml) došlo k poškození axonů. Jako ideální vyšla koncentrace  $3 \times 10^8$  částic/ml (Zhang et al., 2017). Na in vitro modelu myší neuroblastomové buněčné linie, který simuloval perinatální hypoxicko-ischemické poškození, pak bylo pozorováno, že MSC-EVs dokázaly zabránit apoptóze buněk. To probíhalo pravděpodobně prostřednictvím miRNA rodiny let-7-5p miR, která reguluje kaspázu 3 (Joerger-Messerli et al., 2018). Ochranný vliv MSC-EVs na fetální mozek dále popsali Ophelders et al., kteří na ovčím modelu indukovali perinatální hypoxicko-ischemické poškození prostřednictvím okluze pupečníku. MSC-EVs byly podány intravenózně, zatímco kontrole bylo podáno stejné množství 0,9% NaCl. Ukázalo se, že MSC-EVs dokázaly zabránit ztrátě kortikální funkce, částečně také zabránily hypomyelinizaci, ovšem zde se nepotvrdila ochrana proti apoptóze neuronů (Ophelders et al., 2016).





**Obrázek 4 – Růst neuritů u primární kultury neuronů.**

Kortikální neurony rostoucí v médiu obohaceném sekretomem MSCs, mikrovesikly, exosomy a směsí mikrovesiklů a exosomů z MSCs. Na obrázku je možné pozorovat, že exosomy růst podporují, zatímco mikrovesikly jej inhibují. Značení: fluorescenční protilátky proti acetylovanému tubulinu (zeleně) a proteinu asociovanému s mikrotubuly 2 (červeně). Převzato a upraveno: (Lopez-Verrilli et al., 2016)

## 7. Využití MSC-EVs pro léčbu neurologických onemocnění

### 7.1 Neurodegenerativní onemocnění

V současné době je léčba neurodegenerativních onemocnění často pouze symptomatická a nedaří se zastavit degenerativní procesy. To se odvíjí od faktu, že řada léčiv, ale i samotné buňky nejsou schopny procházet přes hematoencefalickou bariéru. Významnou vlastností exosomů je, že přes hematoencefalickou bariéru procházet mohou (Chen et al., 2016). Zdá se však, že mikrovesikly takovou schopnost nemají (Bonafede and Mariotti, 2017).

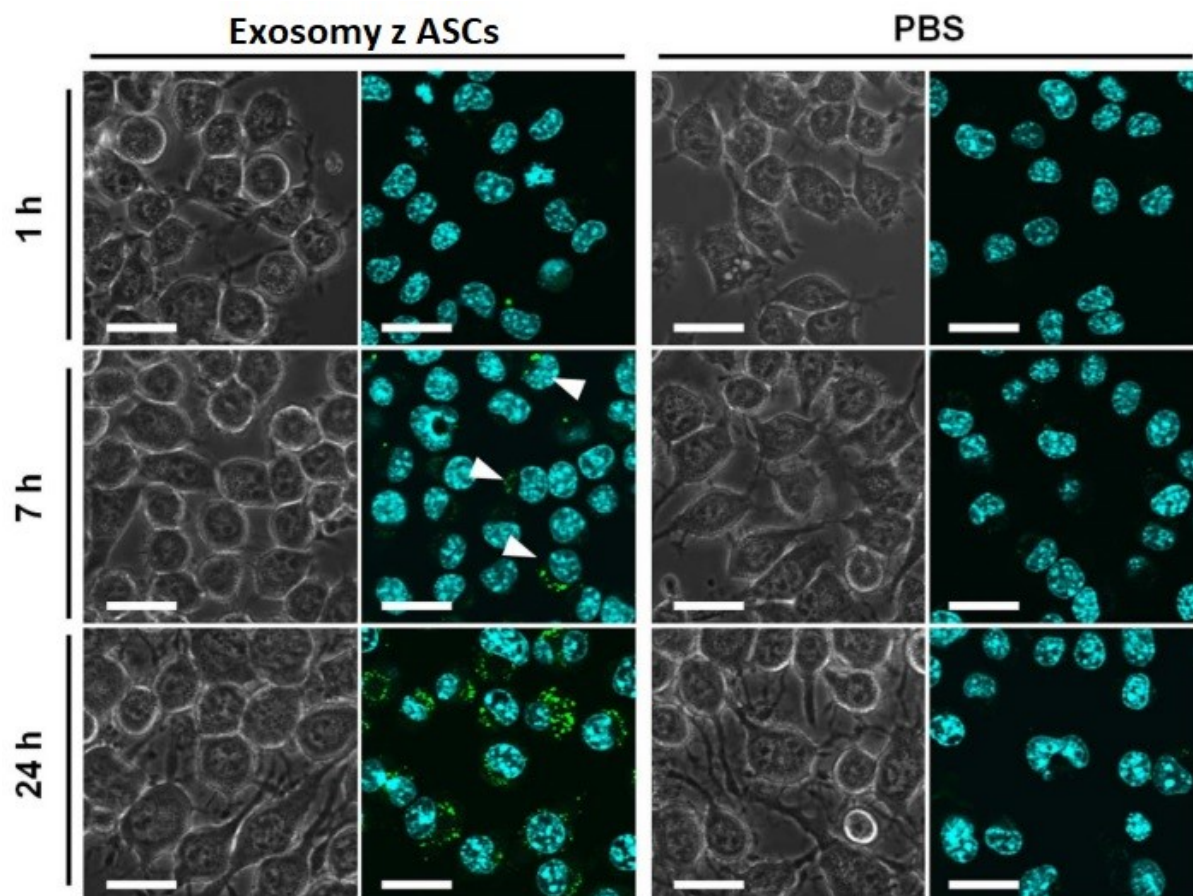
#### 7.1.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD, Alzheimer's disease) je nejčastějším neurodegenerativním onemocněním projevujícím se degenerací synapsí, poruchou kognice a ztrátou paměti. K markerům AD patří přítomnost plaků peptidu amyloid beta ( $A\beta$ ) a neurofibrilární spleti hyperfosforylovaného proteinu Tau (Liew et al., 2017; Reza-Zaldivar et al., 2018). Pro neurony toxický  $A\beta$  vzniká postupnou proteolýzou amyloidového prekurzorového proteinu (APP, amyloid precursor protein) prostřednictvím sekretázy BACE1/ $\beta$  a sekretázy  $\gamma$  (Haass and Strooper, 1999). Právě změna ve zpracování APP a

nedostatečné odbourávání A $\beta$ , vedoucí k jeho akumulaci způsobují rozvoj onemocnění. Rozpad neuronálních mikrotubulů vlivem agregace proteinu Tau postihuje axonální transport a také se podílí na rozvoji onemocnění (Reza-Zaldivar et al., 2018).

Terapeutické účinky MSCs byly již dříve sledovány na modelech AD (Cui et al., 2017; Shin et al., 2014) a pozitivní výsledky byly nedávno zaznamenány i po aplikaci MSC-EVs (Cui et al., 2018; de Godoy et al., 2017). V jedné studii bylo zjištěno, že exosomy z MSCs obsahují enzymaticky aktivní neprilysin (NEP), který je pokládán za nejdůležitější enzym degradující A $\beta$ . Zajímavé bylo to, že mezenchymální kmenové buňky odvozené od tukové tkáně (ASCs, adipose tissue-derived stem cells) se vyznačovaly vyšší expresí NEP, než mezenchymální kmenové buňky odvozené od kostní dřeně (BM-MSCs, bone marrow-derived mesenchymal stem cells). Exosomy odvozné od ASCs a BM-MSCs kultivované společně s neuroblastomovou buněčnou linií N2a (viz. obr. 5), produkující v nadbytku A $\beta$ , zapříčinily výrazné snížení hladiny A $\beta$  jak v médiu, tak intracelulárně. Exosomy nesoucí NEP by tak mohly představovat bezpečnější variantu léčby AD, než dodávání zprostředkované viry (Katsuda et al., 2013). Snížení hladiny A $\beta$  bylo pozorováno i na modelu transgenní APP/PS1 myši, která vykazuje zvýšenou produkci A $\beta$  spojenou s abnormálním chováním. Aplikace MSC-EVs zlepšila schopnosti učení a paměti, podpořila zvýšení exprese synaptického proteinu synapsinu 1 a snížila aktivaci astrocytů a mikroglií. Byla pozorována také snížená hladina prozánětlivých faktorů, zatímco naopak došlo ke zvýšení hladiny protizánětlivých faktorů. V této studii bylo také zjištěno, že MSC-EVs pocházející z hypoxického prostředí, které je pro MSCs více přirozené, mají lepší terapeutické účinky, než MSC-EVs pocházející ze standardních podmínek (21% O<sub>2</sub>) (Cui et al., 2018). Dále bylo na kultuře hipokampálních neuronů potkano pozorováno, že MSC-EVs zabraňují ztrátě synapsí u neuronů vystavených A $\beta$  oligomerům a chrání je před oxidativním stresem tím, že přenášejí aktivní katalázu (de Godoy et al., 2017). Navíc, 20S proteazom detekovaný v exosomech z MSCs se významně podílí na intracelulární degradaci oxidativně poškozených proteinů a bylo prokázáno, že jeho snížená aktivita přispívá k rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova, či Parkinsonova choroba. Exosomy by tedy bylo možné využít i pro dopravu funkčních proteazomů do mozku (Lai et al., 2012).

Zajímavou možností jak zvýšit terapeutické účinky MSC-EVs a snížit hladinu toxických A $\beta$  plaků je genetická modifikace MSCs. Cílem může být zastavení produkce A $\beta$  prostřednictvím malých interferujících RNA (siRNA, small interfering RNA), či jejich degradace prostřednictvím NEP nebo enzymu degradujícího inzulin. Nabízí se také modifikace membrány EV specifickými ligandy či receptory pro neurony, které by zajistily jejich lepší zacílení. MSC-EVs by ale také mohly působit přes gliové buňky (Liew et al., 2017).



**Obrázek 5 – Exosomy z ASCs pohlcené buňkami neuroblastomové linie N2a**

Exosomy z ASCs byly obarveny zelenou fluorescenční barvou PKH67. Po 7 hodinách od aplikace bylo možné indikovat zelenou barvu jen v některých buňkách (šipky), po 24 hodinách už téměř ve všech. Měřítka: 25  $\mu$ m. Převzato a upraveno: (Katsuda et al., 2013)

### 7.1.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD, Parkinson's disease) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním na světě, během kterého dochází ke ztrátě dopaminergních neuronů v substantia nigra. V postižených buňkách se tvoří agregáty proteinů známé jako Lewyho tělíska, což vede ke snížení produkce dopaminu a poškození dopaminergních drah. Nejvíce zasaženo je napojení na striatum, které nedostává signál pro reakci na pohyb (Shen et al., 2016). Onemocnění se tedy projevuje motorickými poruchami, mezi které patří například třes, svalová ztuhlost, zpomalené pohyby a poruchy rovnováhy, ale i nemotorickými poruchami jako je deprese, poruchy spánku a demence (Vilaça-Faria et al., 2019). V jedné studii byly lidské dopaminergní neurony vystaveny oxidativnímu stresu působením 100  $\mu$ mol/L 6-hydroxydopaminu po dobu 2 hodin. Poté bylo médium vyměněno za médium s přidáním EVs odvozenými od kmenových buněk z dřeně mléčných zubů (SHEDs, stem cells from human exfoliated deciduous teeth), které jsou typem MSCs. Použity byly exosomy z SHEDs kultivovaných za standardních podmínek, nebo EVs odvozené od SHEDs kultivovaných na mikronosičích potažených

lamininem v bioreaktoru. Jako kontrola byl využit fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS, phosphate-buffered saline). Zároveň byla každých 10 minut monitorována apoptóza neuronů. Zajímavé bylo, že při kultivaci s exosomy odvozenými od SHEDs ze standardních podmínek se apoptóza dopaminergních neuronů ještě zvýšila. Naopak exosomy odvozené od SHEDs z bioreaktoru dokázaly apoptózu u neuronů snížit o 80%. Toto si autoři vysvětlují tím, že rozdílné kultivační podmínky ovlivňují funkční vlastnosti exosomů. V této studii byl navíc sledován i vliv mikrosomů, které byly odvozené od SHEDs z bioreaktoru. Ukázalo se však, že nebyly účinné. (Jarmalavičiute et al., 2015). Aktuálně je u PD pozornost upřena také směrem k vlivu miRNA. Bylo totiž popsáno hned několik nefunkčních miRNA drah u genů, které souvisí s PD a zároveň byly v exosomech z MSCs detekovány miRNA s imunomodulačními a neuroprotektivními účinky. Konkrétně jde o miR-133b, která byla již zmíněna výše, miR-143 a miR-21, které hrají roli v modulaci zánětlivého prostředí a s tím spojené neuronální smrti, a v neposlední řadě klastr miR-17/92 (Vilaça-Faria et al., 2019).

### 7.1.3 Další neurodegenerativní onemocnění

Nejčastějším neurodegenerativním onemocněním motorických neuronů mozkové kůry, mozkového kmene a míchy u dospělých je Amyotrofická laterální skleróza (ALS, amyotrophic lateral sclerosis). Projevuje se oslabením svalů, jejich atrofií, spasticitou a paralýzou. Obvykle končí úmrtím pacienta po 1 roce až 5 letech od nástupu klinických příznaků (Cleveland and Rothstein, 2001). Nejčastěji je za onemocnění zodpovědná mutace v genu pro Cu/Zn superoxiddismutázu 1 (SOD1, superoxide dismutase 1), která hraje důležitou roli v antioxidační obraně buňky. Byla zjištěna ale i řada dalších mutací (Chen et al., 2013). Bonafede et al. využili exosomy odvozené od ASCs. Exosomy byly kultivovány společně s transfekovanými buňkami linie podobné motoneuronům NSC-34, které exprimovaly několik typů mutací spojených se SOD1. Tyto buňky byly navíc vystaveny oxidativnímu stresu. Nižší dávka exosomů (0.2 µg/ml) měla antiapoptotické účinky a podpořila životaschopnost buněk, zatímco vyšší koncentrace (0.4 µg/ml) překvapivě ochranný efekt snižovala. Autoři se domnívají, že ochranný efekt by mohl být způsoben selektivní inkorporací miRNA do exosomů, zejména miRNA21, miRNA222 a miRNAlet7a, které se uplatňují v inhibici apoptózy, progresi buněčného cyklu a proliferaci (Bonafede et al., 2016).

Exosomy z ASCs byly využity i pro studium léčby Huntingtonovy choroby (HD, Huntington's disease). Jedná se o dědičně podmíněné autozomálně dominantní onemocnění, způsobené abnormální syntézou a akumulací mutovaného proteinu huntingtinu (mHtt). Tyto procesy poškozují neurony převážně v subkortikální oblasti neokortexu a vedou k motorickým i neuropsychiatrickým poruchám, které končí smrtí pacienta (Haddad et al., 2016). Na in vitro HD modelu z myších nervových buněk byla indukována agregace mHtt a po léčbě exosomy z ASCs došlo k redukci vzniklých agregátů. Podobně, jako i v některých jiných studiích vlivu MSC-EVs na modely neurodegenerativních onemocnění, bylo zjištěno, že exosomy mají ochranný vliv na mitochondrie a antiapoptotické účinky. Toto bylo podpořeno

i detekci nižší hladiny proteinů spojených s apoptózou, mezi nimiž byly p53, Bax a rozštěpená kaspáza 3 (Lee et al., 2016).

## 7.2 Ostatní neurologická onemocnění

MSC-EVs a zejména pak exosomy z MSCs byly mimo neurodegenerativní onemocnění sledovány i při dalších neurologických onemocněních. V této práci jsem se konkrétně zaměřila na roztroušenou sklerózu, cévní mozkovou příhodu a traumatické poškození mozku.

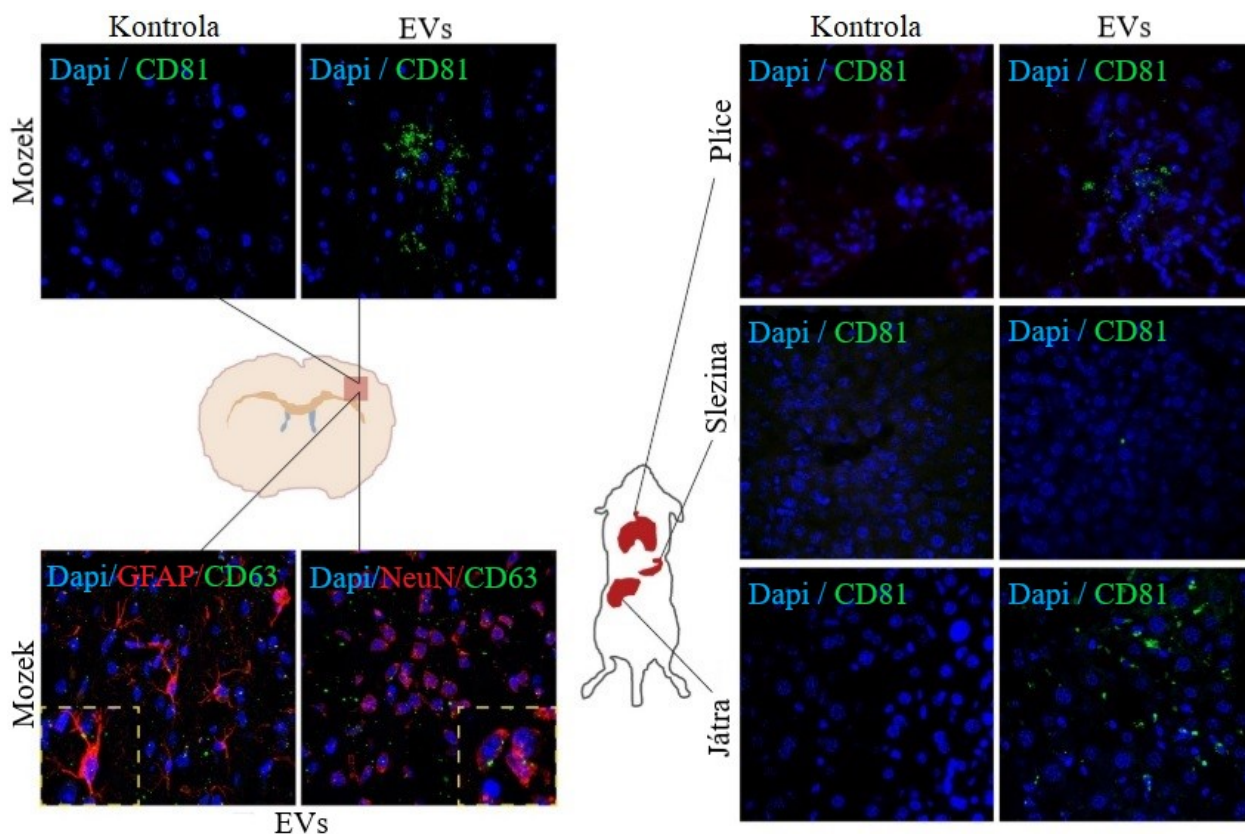
### 7.2.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (MS, multiple sclerosis) je autoimunitní zánětlivé onemocnění CNS postihující především ženy mezi 20 až 40 lety, jehož původ zůstává doposud neobjasněný. Imunitní reakce zprostředkovaná  $CD4^+$  buňkami reaktivními na myelin vede k demyelinizaci, tvorbě lézí převážně v bílé hmotě a ztrátě axonů. Příznaky MS jsou velmi variabilní a zahrnují senzorické, vizuální, cerebrální i motorické symptomy (Garg and Smith, 2015).

Laso-García et al. využili pro studium na myším modelu MS nitrožilně aplikované exosomy z ASCs (viz. obr. 6). Zatímco motorické funkce se po léčbě exosomy zlepšily, paměťový test dosáhl pouze nesignifikantního zlepšení. Bylo pozorováno zmenšení atrofie mozku a snížení počtu lézí, což může být vysvětleno imunomodulačními schopnostmi exosomů z MSCs. Tato schopnost byla doložena i snížením hladin prozánětlivých cytokinů v plazmě. Dále došlo ke zvýšení počtu  $Ki-67^+$  buněk. Exosomy z MSCs tedy podporují buněčnou proliferaci, protože protein Ki-67 je výhradně asociovaný s proliferací. Byl detekován snížený signál znaků pro astrocyty i mikroglie, naopak zvýšený pro proteiny myelinu (Laso-García et al., 2018).

Nedávno byla publikována studie, kde byly exosomy sledovány jednak samostatně, ale také jako nosiče. Část exosomů byla konjugována s aptamery LJM-3064 (Exo-APT), které se vážou na myelin a indukují remyelinizaci. Jejich účinky byly pozorovány nejprve na buněčné linii oligodendrocytů, u nichž v porovnání s aplikací samotných exosomů více podpořily jejich proliferaci. Později byly exosomy a konjugáty porovnány i na myším modelu s rozvinutou MS, kde byly navíc zavedeny skupiny s profylaktickou dávkou. V obou případech došlo ke zmírnění onemocnění. Navíc byla pozorována remyelinizace a imunomodulační efekty, projevující se snížením Th1 odpovědi a podporou populace Treg. K redukci demyelinizované oblasti došlo pouze po profylaktické léčbě Exo-APT. I zde se tedy léčba Exo-APT projevila příznivěji, což naznačuje možné využití exosomů z MSCs i jako konjugátů, či nosičů léčiv (Hosseini Shamili et al., 2019).





**Obrázek 6 – Distribuce EVs v mozku a periferních orgánech.**

EVs byly 2 hodiny po intravenózním podání pozorovány v mozku, plicích, slezině a játrech. Z obrázku je patrné, že nejvíce EVs doputovalo do jater a mozku, naopak ve slezině se takřka nevyskytovaly. EVs značeny protilátkami proti CD81 a CD63 (zeleně), znaky glií: glial fibrillary acidic protein (GFAP) a neuronů: protein specifický pro jádra neuronů (NeuN, neuronal specific nuclear protein) (červeně), buněčná jádra značena 4',6-diamidin-2-fenylindolem (Dapi) (modře). Převzato a upraveno: (Laso-García et al., 2018)

### 7.2.2 Cévní mozková příhoda

Dalším závažným neurologickým onemocněním je cévní mozková příhoda, která celosvětově postihuje přibližně jednoho ze šesti lidí. Jedná se o akutní, náhle se rozvíjející postižení určité části mozkové tkáně, které se rozvíjí po vaskulárním poškození mozku. Může být buď ischemická, která nastává po uzávěru mozkové tepny nebo hemoragická způsobená krvácením z mozkové cévy. V důsledku prodělané cévní mozkové příhody dochází k nekróze všech poškozených buněk a nenávratnému poškození tkáně (Kalladka and Muir, 2014).

Xin et al. sledovali účinky exosomů z MSCs na modelu potkana. Zvířata byla podrobena 2 hodiny trvající MCAo a po 24 hodinách jim bylo intravenózně aplikováno 100 µg proteinu z precipitátů exosomů nebo stejné množství PBS. Po 28 dnech byla zvířata usmrcena. Ačkoliv změna velikosti léze nebyla v porovnání s kontrolou signifikantní, autoři zjistili, že exosomy z MSCs zlepšily funkční zotavení, zvýšily remodelaci neuritů a synaptickou plasticitu. Navíc byla podpořena angiogeneze i

neurogeneze (Xin et al., 2013a). Jiná novější studie se zaměřila na vliv miRNA v těchto procesech. Konkrétně šlo o klastr miR-17-92, který podporuje oligodendrogenezi, neurogenezi a axonální růst. Zvířata obdobných způsobem podstoupila MCAo a byly jim podány exosomy z MSCs transfekovaných plazmidem s miR-17-92 klastrem, druhé skupině byly podány kontrolní exosomy bez miR-17-92 a třetí liposomy. Došlo k funkčnímu zlepšení u obou dvou skupin, kterým byly podány exosomy z MSCs, ovšem léčba exosomy s miR-17-92 klastrem se ukázala jako výhodnější (Xin et al., 2017).

### 7.2.3 Traumatické poranění mozku

Traumatické poranění mozku (TBI, traumatic brain injury) je poškození mozku ke kterému dochází externí silou. Zahrnuje široké spektrum sekundárních patologických stavů nebo funkčních změn mozku. Důsledkem TBI může dojít až k úmrtí (Ye et al., 2017).

Na potkaním modelu TBI bylo v místě levého kortexu indukováno traumatické poranění o hloubce asi 2,5 mm. Den po provedení zranění byly části potkanů intravenózně podány exosomy z MSCs, zatímco kontrolní skupině byl podán PBS. Třetí skupina zvířat nepodstoupila poranění, ani léčbu. Poté byla zvířata pozorována v několika neurologických testech po dobu 35 dnů. Ukázalo se, že léčba exosomy z MSCs podpořila u potkanů prostorové učení, obnovu senzomotorické funkce a angiogenezi. Pozorována byla také zvýšená neurogeneze v gyru dentatu a snížení zánětlivé odpovědi (Zhang et al., 2016b).

## 8. Závěr

MSC-EVs mohou do buněk cílových tkání dopravovat řadu různých biologicky aktivních molekul s terapeutickým efektem a přispívat tak například k jejich regeneraci, modulaci imunitní odpovědi, snížení zánětlivé odpovědi nebo je třeba chránit před apoptózou. Důležitým poznatkem je, že mohou interagovat jak s přilehlými buňkami, tak putovat i na větší vzdálenost přes biologické bariéry.

Tato práce představila MSC-EVs jako slibnou a bezpečnou náhradu využití vlastních buněk, která si zároveň zachovává stejné terapeutické účinky. Poprvé byly MSC-EVs na zvířecím modelu testovány v roce 2010 a to konkrétně na myším modelu ischemicko-reperfuzního poškození. Od té doby však byly jejich terapeutické účinky potvrzeny i na mnoha jiných modelech, včetně modelů neurologických onemocnění, kterým se tato práce blíže věnovala. Byla zaznamenána jak inkorporace MSC-EVs do nervových buněk, tak i jejich ochrana, regenerace a proliferace. Některé studie ovšem poukazují na velmi rozdílné účinky mikrovesiklů a exosomů na nervové buňky. Všechny tyto poznatky mohou přispět k hledání nových terapií pro doposud často neléčitelná onemocnění. Mimo to byly MSC-EVs představeny i jako potencionální nosiče léčiv.

Zatímco využití MSCs se věnuje takřka 900 klinických studií (<https://clinicaltrials.gov/>, online), o využití MSC-EVs se pokouší teprve první. Jedná se tedy o úplnou novinku. Širšímu klinickému využití zatím brání především fakt, že doposud neexistuje jednotná technika izolace EVs a otázkou zůstává i

heterogenita MSC-EVs, která je velmi závislá různých stimulech a jejich původu. Pokud ovšem v budoucnu více porozumíme mechanismům, které určují selektivní inkorporaci různého nákladu, může být tato heterogenita a schopnost buněk produkujících EVs citlivě reagovat na změnu mikroprostředí využita ke zlepšení výsledků léčby.

## 9. Použité zdroje

- Angulski, A. B. B., Capriglione, L. G., Batista, M., Marcon, B. H., Senegaglia, A. C., Stimamiglio, M. A., et al. (2017). The protein content of extracellular vesicles derived from expanded human umbilical cord blood-derived CD133+ and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells partially explains why both sources are advantageous for regenerative medicine. *Stem Cell Rev. Reports* 13, 244–257. doi:10.1007/s12015-016-9715-z.
- Baglio, S. R., Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F. J., Pérez Lanzón, M., Zini, N., et al. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 127. doi:10.1186/s13287-015-0116-z.
- Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., et al. (2015). Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0145686.
- \*Berger, R., and Söder, S. (2015). Neuroprotection in preterm infants. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–14. doi:10.1155/2015/257139.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 7, 1–7. doi:10.1186/1471-2121-7-14.
- \*Bonafede, R., and Mariotti, R. (2017). ALS pathogenesis and therapeutic approaches: the role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1–16. doi:10.3389/fncel.2017.00080.
- Bonafede, R., Scambi, I., Peroni, D., Potrich, V., Boschi, F., Benati, D., et al. (2016). Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Cell Res.* 340, 150–158. doi:10.1016/j.yexcr.2015.12.009.
- Budoni, M., Fierabracci, A., Luciano, R., Petrini, S., Di Ciommo, V., and Muraca, M. (2013). The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant.* 22, 369–379. doi:10.3727/096368911X582769b.
- Chen, C. C., Liu, L., Ma, F., Wong, C. W., Guo, X. E., Chacko, J. V., et al. (2016). Elucidation of



- exosome migration across the blood–brain barrier model in vitro. *Cell. Mol. Bioeng.* 9, 509–529. doi:10.1007/s12195-016-0458-3.
- Chen, J., Liu, Z., Hong, M. M., Zhang, H., Chen, C., Xiao, M., et al. (2014). Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0115316.
- \*Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol. Neurodegener.* 8, 1–15. doi:10.1186/1750-1326-8-28.
- Chen, T. S., Lai, R. C., Lee, M. M., Choo, A. B. H., Lee, C. N., and Lim, S. K. (2010). Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 38, 215–224. doi:10.1093/nar/gkp857.
- \*Cleveland, D. W., and Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehring: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Macmillan Mag. Ltd* 2, 806–819. Available at: [www.nature.com/reviews/neuro](http://www.nature.com/reviews/neuro).
- \*Crivelli, B., Chlapanidas, T., Perteghella, S., Lucarelli, E., Pascucci, L., Brini, A. T., et al. (2017). Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: from active principle to next generation drug delivery system. *J. Control. Release* 262, 104–117. doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.023.
- Cui, G. H., Wu, J., Mou, F. F., Xie, W. H., Wang, F. B., Wang, Q. L., et al. (2018). Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice. *FASEB J.* 32, 654–668. doi:10.1096/fj.201700600R.
- Cui, Y. B., Ma, S. S., Zhang, C. Y., Cao, W., Liu, M., Li, D. P., et al. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer’s disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 320, 291–301. doi:10.1016/j.bbr.2016.12.021.
- de Godoy, M. A., Saraiva, L. M., de Carvalho, L. R. P., Vasconcelos-dos-Santos, A., Beiral, H. J. V., Ramos, A. B., et al. (2017). Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- $\beta$  oligomers. *J. Biol. Chem.* 293, 1957–1975. doi:10.1074/jbc.M117.807180.
- Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P. T., Cassaro, A., et al. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci. Rep.* 6, 1–13. doi:10.1038/srep24120.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for

- Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.
- Eirin, A., Zhu, X. Y., Puranik, A. S., Woollard, J. R., Tang, H., Dasari, S., et al. (2016). Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep36120.
- Ferguson, S. W., Wang, J., Lee, C. J., Liu, M., Neelamegham, S., Canty, J. M., et al. (2018). The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-19581-x.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., and Petrakova, K. V (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 381–90. doi:10.1056/NEJMoa1008862.Diabetes.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., et al. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11. doi:10.1371/journal.pbio.1001604.
- Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L. L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., et al. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc. Res.* 77, 370–376. doi:10.1016/j.mvr.2009.02.001.
- \*Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., et al. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 7. doi:10.1038/cddis.2015.327.
- \*Garg, N., and Smith, T. W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 5, 1–13. doi:10.1002/brb3.362.
- Glassberg, M. K., Minkiewicz, J., Toonkel, R. L., Simonet, E. S., Rubio, G. A., DiFede, D., et al. (2017). Allogeneic human mesenchymal stem cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis via intravenous delivery (AETHER): a phase I safety clinical trial. *Chest* 151, 971–981. doi:10.1016/j.chest.2016.10.061.
- Gonzalez, M. E., Martin, E., Anwar, T., Arellano-garcia, C., Lama, A., Chen, Y., et al. (2017). Mesenchymal stem cell induced DDR2 mediates stromal-breast cancer interactions and metastasis growth. 18, 1215–1228. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.079.Mesenchymal.
- \*Haass, C., and De Strooper, B. (1999). The presenilins in Alzheimer's disease - proteolysis holds the key. *Science (80-. )*. 286, 916–919. doi:10.1126/science.286.5441.916.
- \*Haddad, M. S., Wenceslau, C. V., Pompeia, C., and Kerkis, I. (2016). Cell-based technologies for Huntington's disease. *Dement. Neuropsychol.* 10, 287–295. doi:10.1590/s1980-5764-

- Haraszti, R. A., Didiot, M. C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., et al. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* 5, 1–14. doi:10.3402/jev.v5.32570.
- \*Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 9, 1–14. doi:10.1186/1478-811X-9-12.
- Hosseini Shamili, F., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Mahmoudi, M., Kalantari, M., et al. (2019). Immunomodulatory properties of MSC-derived exosomes armed with high affinity aptamer toward myelin as a platform for reducing multiple sclerosis clinical score. *J. Control. Release* 299, 149–164. doi:10.1016/j.jconrel.2019.02.032.
- Jarmalavičiute, A., Tunaitis, V., Pivoraite, U., Venalis, A., and Pivoriunas, A. (2015). Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy* 17, 932–939. doi:10.1016/j.jcyt.2014.07.013.
- Joerger-Messerli, M. S., Oppliger, B., Spinelli, M., Thomi, G., di Salvo, I., Schneider, P., et al. (2018). Extracellular vesicles derived from wharton’s jelly mesenchymal stem cells prevent and resolve programmed cell death mediated by perinatal hypoxia-ischemia in neuronal cells. *Cell Transplant.* 27, 168–180. doi:10.1177/0963689717738256.
- \*Kalladka, D., and Muir, K. W. (2014). Brain repair: cell therapy in stroke. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 7, 31–44. doi:10.2147/SCCAA.S38003.
- Kassem, D. H., Kamal, M. M., El-Kholy, A. E. L. G., and El-Mesallamy, H. O. (2016). Exendin-4 enhances the differentiation of Wharton’s jelly mesenchymal stem cells into insulin-producing cells through activation of various  $\beta$ -cell markers. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 1–11. doi:10.1186/s13287-016-0374-4.
- Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., et al. (2013). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep.* 3, 1–11. doi:10.1038/srep01197.
- \*Kaundal, U., Bagai, U., and Rakha, A. (2018). Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: A potential key to successful solid organ transplantation. *J. Transl. Med.* 16, 1–16. doi:10.1186/s12967-018-1403-0.
- \*Keshtkar, S., Azarpira, N., and Ghahremani, M. H. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 1–9. doi:10.1186/s13287-018-0791-7.

- Kim, D., Nishida, H., An, S. Y., Shetty, A. K., Bartosh, T. J., and Prockop, D. J. (2015). Chromatographically isolated CD63 + CD81 + extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 170–175. doi:10.1073/pnas.1522297113.
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003.
- Lai, R. C., Tan, S. S., Teh, B. J., Sze, S. K., Arslan, F., de Kleijn, D. P., et al. (2012). Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int. J. Proteomics* 2012, 1–14. doi:10.1155/2012/971907.
- Lai, R. C., Tan, S. S., Yeo, R. W. Y., Choo, A. B. H., Reiner, A. T., Su, Y., et al. (2016). MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *J. Extracell. Vesicles* 5, 1–12. doi:10.3402/jev.v5.29828.
- Laso-García, F., Ramos-Cejudo, J., Carrillo-Salinas, F. J., Otero-Ortega, L., Feliú, A., Gómez-de Frutos, M. C., et al. (2018). Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells in a model of progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 13, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0202590.
- \*Lee, D. K., and Song, S. U. (2018). Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cell. Immunol.* 326, 68–76. doi:10.1016/j.cellimm.2017.08.009.
- Lee, M., Liu, T., Wooseok Im, and Kim, M. (2016). Exosomes from adipose-derived stem cells ameliorate phenotype of Huntington's disease in vitro model. *Eur. J. Neurosci.* 44, 2114–2119. doi:10.1111/ejn.13275.
- Leibacher, J., Dauber, K., Ehser, S., Brixner, V., Kollar, K., Vogel, A., et al. (2017). Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice. *Cytotherapy* 19, 61–74. doi:10.1016/j.jcyt.2016.09.010.
- \*Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., and Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics* 7, 789–804. doi:10.7150/thno.18133.
- \*Liew, L. C., Katsuda, T., Gailhouste, L., Nakagama, H., and Ochiya, T. (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. *Int. Immunol.* 29, 11–19. doi:10.1093/intimm/dxx002.
- \*Lo Furno, D., Mannino, G., and Giuffrida, R. (2018). Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *J. Cell. Physiol.* 233, 3982–3999. doi:10.1002/jcp.26192.

- Lopez-Verrilli, M. A., Caviedes, A., Cabrera, A., Sandoval, S., Wyneken, U., and Khoury, M. (2016). Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience* 320, 129–139. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.061.
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., et al. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282. doi:10.1038/ncomms1285.
- Najar, M., Raicevic, G., Kazan, H. F., De Bruyn, C., Bron, D., Toungouz, M., et al. (2012). Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev. Reports* 8, 1188–1198. doi:10.1007/s12015-012-9408-1.
- \*Nooshabadi, V. T., Mardpour, S., Yousefi-Ahmadipour, A., Allahverdi, A., Izadpanah, M., Daneshimehr, F., et al. (2018). The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. *J. Cell. Biochem.* 119, 8048–8073. doi:10.1002/jcb.26726.
- Ophelders, D. R. M. G., Wolfs, T. G. A. M., Jellema, R. K., Zwanenburg, A., Andriessen, P., Delhaas, T., et al. (2016). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles protect the fetal brain after hypoxia-ischemia. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 754–763. doi:10.5966/sctm.2015-0197.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-. ). 284, 143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
- \*Poltavtseva, R. A., Poltavtsev, A. V., Lutsenko, G. V., and Svirshchetskaya, E. V. (2018). Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res.* 375, 563–574. doi:10.1007/s00441-018-2961-4.
- \*Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., and Ritter, T. (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol. Ther.* 23, 812–823. doi:10.1038/mt.2015.44.
- \*Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., et al. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847–856. doi:10.1038/sj.leu.2404132.
- \*Reza-Zaldivar, E. E., Hernández-Sapiéns, M. A., Minjarez, B., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Márquez-Aguirre, A. L., and Canales-Aguirre, A. A. (2018). Potential effects of MSC-derived exosomes in

- neuroplasticity in alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–16. doi:10.3389/fncel.2018.00317.
- Røsland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., et al. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 69, 5331–5339. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4630.
- \*Shen, Y., Huang, J., Liu, L., Xu, X., Han, C., Zhang, G., et al. (2016). A compendium of preparation and application of stem cells in parkinson's disease: current status and future prospects. *Front. Aging Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnagi.2016.00117.
- Shin, J. Y., Park, H. J., Kim, H. N., Oh, S. H., Bae, J. S., Ha, H. J., et al. (2014). Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase  $\beta$ -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy* 10, 32–44. doi:10.4161/auto.26508.
- \*Soria, F. N., Pampliega, O., Bourdenx, M., Meissner, W. G., Bezard, E., and Dehay, B. (2017). Exosomes, an unmasked culprit in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* 11, 1–12. doi:10.3389/fnins.2017.00026.
- Takeda, Y. S., and Xu, Q. (2015). Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0135111.
- Tan, S. S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Zhang, B., et al. (2013). Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J. Extracell. Vesicles* 2, 22614. doi:10.3402/jev.v2i0.22614.
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Panchalingam, K. M., Rodrigues, A. J., Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S., et al. (2017). Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of Parkinson's disease. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 634–646. doi:10.5966/sctm.2016-0071.
- Teo, G. S. L., Ankrum, J. A., Martinelli, R., Boetto, S. E., Simms, K., Sciuto, T. E., et al. (2012). Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells* 30, 2472–2486. doi:10.1002/stem.1198.
- Turtzo, L. C., Budde, M. D., Dean, D. D., Gold, E. M., Lewis, B. K., Janes, L., et al. (2015). Failure of intravenous or intracardiac delivery of mesenchymal stromal cells to improve outcomes after focal traumatic brain injury in the female rat. *PLoS One* 10, e0126551. doi:10.1371/journal.pone.0126551.

- Van Velthoven, C. T. J., Kavelaars, A., Van Bel, F., and Heijnen, C. J. (2011). Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain. *Brain. Behav. Immun.* 25, 1342–1348. doi:10.1016/j.bbi.2011.03.021.
- \*Vilaça-Faria, H., Salgado, A. J., and Teixeira, F. G. (2019). Mesenchymal stem cells-derived exosomes: a new possible therapeutic strategy for parkinson's disease? *Cells* 8, 118. doi:10.3390/cells8020118.
- \*Volkman, R., and Offen, D. (2017). Concise review: mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. *Stem Cells* 35, 1867–1880. doi:10.1002/stem.2651.
- Wang, F. J., Eid, S., Dennis, J. E., Cooke, K. R., Auletta, J. J., and Lee, Z. (2015). Route of delivery influences biodistribution of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells following experimental bone marrow transplantation. *J. Stem Cells Regen. Med.* 11, 34–43.
- \*Willis, G. R., Kourembanas, S., and Mitsialis, S. A. (2017). Toward exosome-based therapeutics: isolation, heterogeneity, and fit-for-purpose potency. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, 1–13. doi:10.3389/fcvm.2017.00063.
- Xin, H., Katakowski, M., Wang, F., Qian, J. Y., Liu, X. S., Ali, M. M., et al. (2017). MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 48, 747–753. doi:10.1161/STROKEAHA.116.015204.
- Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J. J., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (2013a). Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1711–1715. doi:10.1038/jcbfm.2013.152.
- Xin, H., Li, Y., Katakowski, M., Buller, B., Zhang, Y., Shang, X., et al. (2012). Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells* 30, 1556–1564. doi:10.1002/stem.1129.
- Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., et al. (2013b). MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells* 31, 2737–2746. doi:10.1002/stem.1409.
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., et al. (2013). Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 336–341. doi:10.1016/j.addr.2012.07.001.
- \*Yu, B., Zhang, X., and Li, X. (2014). Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4142–4157. doi:10.3390/ijms15034142.

Zhang, B., Shen, L., Shi, H., Pan, Z., Wu, L., Yan, Y., et al. (2016). Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells: identification, purification, and biological characteristics. *Stem Cells Int.* 2016, 1–11. doi:10.1155/2016/1929536.

Zhang, Y., Chopp, M., Liu, X. S., Katakowski, M., Wang, X., Tian, X., et al. (2017). Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons. *Mol. Neurobiol.* 54, 2659–2673. doi:10.1007/s12035-016-9851-0.

**\*review jsou označeny hvězdičkou**

#### **Další použité zdroje:**

Mesenchymal stem cells extracellular vesicles, clinicaltrials.gov [online databáze], Aktualizováno: 28. 2. 2019, citováno: 24. 4. 2019. Dostupné z:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Mesenchymal+stem+cells+extracellular+vesicles&cntry=&state=&city=&dist=>